

JP2001321192 A

METHOD FOR PREPARING PROTEIN SAMPLE FOR STRUCTURAL ANALYSIS

AJINOMOTO CO INC

Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for preparing a protein sample for the structural analysis suitable for the structural analysis of a protein. **SOLUTION:** This method for preparing a protein sample for the structural analysis comprises (i) reacting a protein with a compound containing a primary amino group by the action of a transglutaminase and/or (ii) reacting a protein with a peptide containing a glutamine residue by the action of a transglutaminase.

Inventor(s):

SHINBA NOBUHISA
SUZUKI EIICHIRO
YOKOYAMA KEIICHI

Application No. 2000141151 JP2000141151 JP, **Filed** 20000515, **A1 Published** 20011120

Original IPC(1-7): C12P02102

G01N03368 C07K005027

Patents Citing This One No US, EP, or WO patent/search reports have cited this patent.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-321192
(P2001-321192A)

(43) 公開日 平成13年11月20日 (2001. 11. 20)

(51) Int.Cl.⁷ 識別記号

C 1 2 P 21/02

G 0 1 N 33/68

// C 0 7 K 5/027

Z N A

F I

C 1 2 P 21/02

G 0 1 N 33/68

C 0 7 K 5/027

--- テーブル --- (参考) ---

B 2 G 0 4 5

4 B 0 6 4

Z N A 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2000-141151 (P2000-141151)

(22) 出願日 平成12年 5 月15日 (2000. 5. 15)

(71) 出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋 1 丁目15番 1 号

(72) 発明者 榛葉 信久

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の

素株式会社中央研究所内

(72) 発明者 鈴木 榮一郎

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の

素株式会社中央研究所内

(74) 代理人 100059959

弁理士 中村 稔 (外 9 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 構造解析用タンパク質試料の調製方法

(57) 【要約】

【解決課題】 タンパク質の構造解析に適した構造解析用タンパク質試料を調製する方法を提供する。

【解決手段】 (i) トランスグルタミナーゼの作用によってタンパク質と 1 級アミノ基を含む化合物を反応させること、および/または、(ii) トランスグルタミナーゼの作用によってタンパク質とグルタミン残基を含むペプチドを反応させること、を含む、構造解析用タンパク質試料の調製方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (i) トランスグルタミナーゼの作用によってタンパク質と1級アミノ基を含む化合物を反応させること、および/または、(ii) トランスグルタミナーゼの作用によってタンパク質とグルタミン残基を含むペプチドを反応させること、を含む、構造解析用タンパク質試料の調製方法。

【請求項2】 1級アミノ基を含む化合物、及び/又はグルタミン残基を含むペプチドが安定同位体を含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】 1級アミノ基を含む化合物が、更に親水性の官能基又は水素結合のドナー若しくはアクセプターとなる官能基を含んだ化合物である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 1級アミノ基を含む化合物がヒドロキシルアミン、グリシン、リジン、硫酸水素アミノエチル、リン酸アミノエチル、アミノエタノールおよびリジンを含むペプチドからなる群より選ばれる、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 グルタミン残基を含むペプチドがN-カルボベンゾキシ-L-グルタミル-グリシン、N-カルボベンゾキシ-L-グリシル-グリシル-グルタミル-グリシンおよびN-カルボベンゾキシ-L-グリシル-グリシル-グルタミル-グリシンからなる群より選ばれる、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 構造解析がNMR構造解析または結晶構造解析である請求項1～5に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】 本発明は、構造解析用タンパク質試料の調製方法に関する。より具体的には、タンパク質の物性を向上させることにより、立体構造の解析に適したタンパク質試料を調製する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 タンパク質の構造解析にはX線やNMRを利用するケースが多いが、前者による解析には試料となるタンパク質の溶解性および結晶性が、後者による解析には該タンパク質の溶解性及び安定性が高いことが要求される。そのような構造解析を行なうために適したタンパク質試料を調製する目的で、タンパク質の物性を穏やかに改善する方法がいくつか報告されている。例えば、結晶構造解析においては、膜タンパク質の疎水面同士の間を回避するために抗体を結合させたり脂質を混入する方法 (Iwata, S. et al. (1995) Nature 376, 660. Shinzawa-Itoh, K. et al. (1995) J. Mol. Biol. 246, 572.) などが挙げられ、NMR解析においては、界面活性剤や塩を含んだ溶媒を用いてタンパク質の会合を防ぐ方法 (Anglistter, J. et al. (1993) J. Biomol. NMR 3, 121. Zhang, O. et al. (1995) Biochemistry 34, 6784.) などがあ

件とは異なるため、生体内における構造を反映しない場合があるという問題があった。また、タンパク質の性質に依存して溶解条件や結晶化条件を試行錯誤により検討する必要があり、労力や時間を省略するためにも適用範囲の広い手法の開発が望まれていた。構造解析に基づいてタンパク質工学又はドラッグデザインが行なわれている現在、前述のような物性が改善された、構造解析用タンパク質試料を調製する意義は大きい。

【0003】 構造解析用タンパク質試料の調製を目的としてタンパク質の物性を改善する方法の一つとして、部位特異変異が挙げられる。しかし、この方法は、個別のタンパク質で発現系を構築する必要がある上、アミノ酸残基固有の官能基であるカルボキシアミド基や水酸基などしか導入することができないという問題があった。例えばスルホニル基やリン酸基の導入により溶解性の向上が期待できるが、部位特異変異ではこれらの官能基を導入することができない。化学反応によって修飾しアミノ酸残基固有の官能基以外を導入することも可能であるが、この場合はタンパク質の変性や副次的な反応を回避する必要があり、導入できる官能基の種類が限られている。

【0004】 一方、トランスグルタミナーゼは、タンパク質のペプチド鎖内にある γ -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素である。本酵素をタンパク質に作用させると $\epsilon-(\gamma\text{-Glu})\text{-Lys}$ 架橋形成反応、グルタミン残基の脱アミド化によるグルタミン酸残基への置換反応が起こりうる。トランスグルタミナーゼは、ゼラチン、チーズ、ヨーグルト、豆腐、蒲鉾、ハム、ソーセージ、麺類などの食品の製造や食肉の肉質改善等に広く利用されている (特開昭64-27471)。また、熱に安定なマイクロカプセルの素材、固定化酵素の担体などの製造に利用されているなど、産業上利用性の高い酵素として知られている。それにもかかわらず、トランスグルタミナーゼの産業応用は、タンパク質の架橋に伴うゲル化や、それに付随した代謝・分解の抑制といった分野にとどまっている。また、研究への応用については、蛍光試薬又はキレート試薬を導入することによってトランスグルタミナーゼの活性を評価したり、担体をカラム樹脂に結合させる等、極めて限られた目的に利用しているに過ぎなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、タンパク質の構造解析に適した構造解析用タンパク質試料を調製する方法を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、タンパク質分子中のグルタミン残基及び/又はリジン残基を特定の化合物で修飾すると、その構造を大きく変化させることなくタンパク質の物性を変化させ得ることに注目し、更に、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、

トランスグルタミナーゼによる触媒反応を利用してタンパク質のグルタミン残基を1級アミノ基を含む化合物で修飾する、及び／又はリジン残基をグルタミン残基を含むペプチドにより修飾すると、そのタンパク質の物性を構造解析に適したものに改善することができること、また、安定同位体を含む官能基の導入も可能であること見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、

(i) トランスグルタミナーゼの作用によってタンパク質と1級アミノ基を含む化合物を反応させること、および／または、(ii) トランスグルタミナーゼの作用によってタンパク質とグルタミン残基を含むペプチドを反応させること、を含む、構造解析用タンパク質試料の調製方法である。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明に使用される酵素であるトランスグルタミナーゼはタンパク質のペプチド鎖内にあるグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素である。このタンパク質がアシル受容体としてタンパク質中のリジン残基の ϵ -アミノ基に作用すると蛋白質分子中及び分子間において ϵ - (γ -Glu) -Lys結合が形成される。

【0008】本発明は、トランスグルタミナーゼ触媒反応を利用して、タンパク質のグルタミン残基又はリジン残基、又はその両方の修飾を行う工程を含む。図1に酵素反応様式を模式的に示した。式1、式3はそれぞれグルタミン残基、リジン残基を含むタンパク質を示しており、 R_1 、 R_1' はペプチド鎖、N末端アミノ酸又は水素のいずれか、 R_2 、 R_2' はペプチド鎖、C末端アミノ酸又は水酸基のいずれかを示し、該タンパク質がトランスグルタミナーゼの基質となる限りにおいて特に制限はない。式2はトランスグルタミナーゼが作用する1級アミノ基を含む化合物を示しており、 R_3 に制限はなく、式2で示した1級アミノ基を含む化合物の具体例としては、ヒドロキシルアミン、グリシン、リジン、硫酸水素アミノエチル、リン酸アミノエチル、アミノエタノール、リジンを含むペプチドなどを挙げることができる。式4はトランスグルタミナーゼが作用するグルタミン残基を含むペプチドで、 R_3' はペプチド鎖、N末端アミノ酸又は水素のいずれか、 R_4' はペプチド鎖、C末端アミノ酸又は水酸基のいずれかを示し、該ペプチドがトランスグルタミナーゼの基質となる限りにおいて特に制限はない。式4で示したグルタミン残基を含むペプチドは、カルボベンゾキシ基、糖鎖、ミリストイル基、リン酸基のような置換基で修飾されていてもよく、その具体例としては、N-カルボベンゾキシ-L-グルタミル-グリシン (N-carbobenzoxyl-L-glutamyl-glycine) (CBZ-Gln-Gly)、N-カルボベンゾキシ-L-グルタミル-グルタミル-グリシン (N-carbobenzoxyl-L-glutamyl-glutamyl-glycine) (CBZ-Gln-Gln-Gly)、N-カルボベンゾキシ-L-グリシル-グリシル-グルタミル-グリシン (N-carbobenzoxyl-L-glycyl-glycyl-glu-

tamyl-glycine) (CBZ-Gly-Gly-Gln-Gly)などを挙げることができる。

【0009】本発明の方法において修飾すべきタンパク質としては、アルブミン、イムノグロブリン、血液凝固因子などのヒト血漿成分；プロテアーゼ、トランスフェラーゼなどの酵素；成長ホルモン、エリスロポエチンなどのホルモン；細胞増殖、抑制などの細胞増殖因子；細胞分化、誘導、刺激などの免疫反応調節因子；モノカイン、サイトカイン、リンホカインなどの細胞産性生物学的活性タンパク質；等を広く挙げることができる。これらのタンパク質は、その由来を問わず、動物由来のものであっても、植物由来のものであっても、微生物由来のものであってもよい。また、大腸菌、酵母、動物細胞等にこれらタンパク質の遺伝子を組み込み発現させたタンパク質、又は、無細胞タンパク質合成系を利用して発現させたタンパク質であってもよい。

【0010】トランスグルタミナーゼによって修飾されるタンパク質は、分子中に少なくとも1個のトランスグルタミナーゼの作用を受けるグルタミン残基又はリジン残基を有するものである。分子中のグルタミン残基、又はリジン残基がトランスグルタミナーゼの作用を受けるかどうかは、例えば、修飾を受けたタンパク質のマススペクトルを測定し、修飾に伴う分子量の増加を検出することで確認することができる。タンパク質がトランスグルタミナーゼの作用を受けるグルタミン残基又はリジン残基を有しない場合には、トランスグルタミナーゼの作用を受けるグルタミン残基又はリジン残基を部位特異変異によって導入することも可能である。

【0011】トランスグルタミナーゼとしてはカルシウム非依存性のものとカルシウム依存性のものがあり、何れも本発明に使用することができる。前者の例としては、放線菌、枯草菌等の微生物由来のもの（例えば、特開昭64-27471号公報参照。）を挙げることができる。後者の例としてはモルモット肝臓由来のもの（例えば、特公平1-50382号公報参照。）、ヒト表皮ケラチン細胞トランスグルタミナーゼ (Phillips, M. A. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 9333.)、ヒト血液凝固因子XIII (Ichinose, A. et al. (1990) Biochemistry 25, 6900.)、卵菌等の微生物由来のもの、牛血液、豚血液等の動物由来のもの、サケ、マダイ等の魚由来のもの（例えば、関信夫等、「日本水産学会誌」56巻125～132頁、1990年）、カキ由来のもの、等を挙げることができる。この他、遺伝子組み換えにより製造されるもの（例えば、特開平1-300889号公報、特開平6-225775号公報、特開平7-23737号公報参照。）等、を挙げることができる。

【0012】本発明には何れのトランスグルタミナーゼでも使用することができ、起源及び製法に限定されることはない。但し、物性を改善すべきタンパク質の性質に

よってはカルシウムを含む溶媒中での酵素反応に不向きなものもあるため、そのようなタンパク質についてはカルシウム非依存性のトランスグルタミナーゼを使用することが好ましい。例えば、上記微生物由来のトランスグルタミナーゼ（例えば、特開昭64-27471号公報参照。）等は何れの条件をも満足するのでもあり、現時点では最適とすることができる。例えば、ストレプトベルチシリウム・グリセオカルネウム（*Streptoverticillium griseocarneum*）IFO 12776、ストレプトベルチシリウム・シナモネウム（*Streptoverticillium cinnamomeum* subsp. *cinnamomeum*）IFO 12852、ストレプトベルチシリウム・モバラエンス（*Streptoverticillium morabaraense*）IFO 13819等に由来するトランスグルタミナーゼである。本発明に使用するトランスグルタミナーゼの活性単位は、次のようにして測定され、かつ定義される。即ち、ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミニルグリシンとヒドロキシシアミンを基質として反応を行い、生成したヒドロキサム酸をトリクロル酢酸存在下で鉄錯体に変換させた後、525nmの吸光度で、その量を測定する。このようにしてヒドロキサム酸の量より検量線を作成し、1分間に1μモルのヒドロキサマトを生成させる酵素量をトランスグルタミナーゼの活性単位、1ユニットと定義する。この測定法の詳細は既に報告されている通り（例えば、特開昭64-27471号公報等参照。）である。

【0013】タンパク質の構造解析にはX線若しくは中性子線、またはNMRを利用する場合が多い。X線や中性子線による解析には高い溶解性と結晶性が、NMRによる解析には高い溶解性と安定性が要求される。これらの条件を満たさないものについては、解析対象とするタンパク質の溶解性、安定性及び結晶性を改善して適切なタンパク質試料を調製する必要がある。タンパク質の溶解性の改善とは、溶媒に溶け得るタンパク質のモル数を増大させること、及びタンパク質の会合を回避することである。低濃度のタンパク質溶液ではX線あるいは中性子線結晶解析に必要な結晶化が難しく、また、NMR測定においては十分なシグナル強度が得られない。更に、タンパク質の会合は、NMRシグナルの広幅化を引き起こし、構造解析の障害となる。結晶構造解析やNMR解析においては、0.1mM以上の濃度のタンパク質溶液を、より好ましくは0.5mM以上の濃度のタンパク質溶液を作成することが望ましい。本発明によれば、天然の状態で溶解性の低いタンパク質からも構造解析に適したタンパク質試料を調製することができる。

【0014】タンパク質の安定性の改善とは、デグラデーションや変性を引き難くすること、及び温度、pH、塩濃度などの変化に伴う会合や交換反応を含む種々の変化を生じ難くすることである。NMR解析においては、タンパク質分子の回転・並進運動の増大に伴ってシグナル緩和が軽減され、解析しやすいスペクトルが得られることが

知られている。そのため、回転・並進運動を増大させるために、タンパク質が安定に保たれる範囲で、なるべく高い温度で測定する傾向がある。したがって、高い温度に対して安定なタンパク質はNMR解析に適し、構造解析対象となり得る。また、タンパク質のNMRシグナルを帰属するとき、アミドプロトンシグナルを基軸とすることが多い。しかし、pHの上昇に伴い水との交換速度が増大し、アミドプロトンシグナルが観測できなくなってしまう場合がある。したがって、NMR構造解析には、タンパク質が広い範囲のpH領域において安定であることが望ましい。

【0015】タンパク質の結晶性の改善とは、タンパク質をより結晶化し易くすることである。タンパク質の結晶性は、タンパク質分子表面の電荷の分布や疎水性領域の露出度などに応じて決まる。そこで、表面電荷や疎水度を変えることで結晶性を向上させ、結晶構造解析へ利用することが可能となる。さらに、構造解析には、修飾する化合物として安定同位体を含んだものを用いることが好ましい。例えば、修飾する化合物を¹³Cで標識すると、¹³C編集又はフィルターNMR実験が適用でき、重複していたNMRシグナルを分離して観測することが可能となる。その結果、より正確に構造情報が抽出され、精密な立体構造決定へと結びつく。修飾する化合物に導入する安定同位体としては、¹Hに対しては²H又は³H、¹²Cに対しては¹³C、¹⁴Nに対しては¹⁵N、¹⁶Oに対しては¹⁷O又は¹⁸O等が挙げられる。天然のタンパク質には¹H、¹²C、¹⁴N、¹⁶Oが多く含まれているため、これらの核種を同位体で置換する場合が多いが、本方法は水素原子、炭素原子、窒素原子、酸素原子の同位体標識に限定されるものではない。

【0016】タンパク質の溶解性を向上させるためには、例えば、カルボキシル基、アミノ基、スルホニル基、リン酸基などの親水性の官能基を含んだ化合物でタンパク質を修飾することが望ましく、式2の化合物としてはグリシン、リジン、硫酸水素アミノエチル、リン酸アミノエチル、ポリエチレングリコールや多糖を含むアミノ基供与体、リジンを含むペプチドなど、式4の化合物としてはCBZ-Gln-Gly、CBZ-Gln-Gln-Gly、CBZ-Gly-Gly-Gln-Glyなどが挙げられる。安定性を向上させるためには、例えば、カルボキシル基、アミノ基、スルホニル基、リン酸基などの親水性の官能基を含んだものや水素結合のドナーやアクセプターとなる官能基を含んだ化合物でタンパク質を修飾することが望ましく、より具体的には、式2の化合物としてはヒドロキシシアミン、グリシン、リジン、硫酸水素アミノエチル、リン酸アミノエチル、アミノエタノール、リジンを含むペプチドなど、式4の化合物としてはCBZ-Gln-Gly、CBZ-Gln-Gln-Gly、CBZ-Gly-Gly-Gln-Glyなどが挙げられる。溶解性と安定性は常に同時達成されるわけではないが、一般には溶解性が向上すると安定性も増すことが多い。より好ましくは

溶解性と安定性の両方の性質を同時に改善する化合物を利用する。また、結晶性を向上させるためには、修飾すべきタンパク質の表面電荷や疎水性を変えるものが望ましく、式2の化合物として、ヒドロキシアミン、グリシン、抗体、抗体のFcフラグメントおよびその一部などが挙げられる。

【0017】修飾すべきタンパク質と1級アミノ基を含む化合物又はグルタミン残基を含むペプチドとをトランスグルタミナーゼの存在下に反応せしめるには、通常のトランスグルタミナーゼの作用条件下で、トランスグルタミナーゼ、修飾すべきタンパク質および1級アミノ基を含む化合物又はグルタミン残基を含むペプチドを共存させればよく、例えば、水性溶媒中で約pH5.0～約pH9.0の範囲で、より好ましくは約pH6.0～約pH8.0の範囲で、温度約4℃～約55℃の範囲で、より好ましくは約25℃～約40℃の範囲で、修飾すべきタンパク質、1級アミノ基を含む化合物又はグルタミン残基を含むペプチド、及びトランスグルタミナーゼを保持すればよい。反応時間には特に制限はないが、約30秒～や約7日、より好ましくは約1分～約2日とする。この反応において、修飾すべきタンパク質の濃度は約1M～約40mM、1級アミノ基を含む化合物又はグルタミン残基を含むペプチドの濃度は約10 μ M～約10Mの範囲が望ましく、修飾すべきタンパク質に対し1級アミノ基を含む化合物又はグルタミン残基を含むペプチドの濃度を1倍以上とするのがよく、より好ましくは約20倍以上とする。また、トランスグルタミナーゼの使用量は、約10nM～約100 μ Mの範囲が望ましく、これはタンパク質1mmol当り約0.01～約20ユニットに相当する。

【0018】かくしてトランスグルタミナーゼを作用させることにより、1級アミノ基を含む化合物又はグルタミン残基を含むペプチドによりタンパク質が修飾され、当該タンパク質の物性が構造解析に適したものに改善され、その結果、構造解析用タンパク質試料が調製される。このような修飾によるタンパク質の溶解性および／又は安定性の改善に伴いNMRによる構造解析が可能になる上、更に、導入した化合物を安定同位体標識すれば精度の高い構造解析につながる。一方、タンパク質の溶解性および／又は結晶性の向上は、X線結晶構造解析に役立つ。両方法によって得られた構造情報は、タンパク質工学又はドラッグデザインへ反映させることができる。例えば、レセプターなどの膜タンパク質を水溶媒中に可溶化することが可能となる。NMR解析及び結晶構造解析が可能となった可溶化レセプター分子の構造情報をもとに、アゴニスト又はアンタゴニストを設計し、新規薬物の発見へと発展させることができる。トランスグルタミナーゼを利用することによって、グルタミン残基とリジン残基の両方、もしくは一方を修飾できることから、当該タンパク質の配列や形に応じて、さまざまな修飾タンパク質を作成することができる利点がある。更に、酵素

によってタンパク質を修飾する場合、当該タンパク質の表面に位置する官能基が修飾されるため、立体構造が損われにくいと考えられる。これは、タンパク質の立体構造の内部に位置するアミノ酸残基まで修飾される化学的修飾法に比較して大きな利点である。以下、本発明を実施例に従って説明する。尚、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0019】

【実施例】以下の実施例において、酵素としてStreptovorticillium由来のトランスグルタミナーゼ（以下MTGと略す）、1級アミンとしてグリシンを用い、荷電を帯びたカルボン酸を導入することによってタンパク質の物性改善を試みた。また、グリシンの窒素を¹⁵N標識（以下、¹⁵N標識グリシンと呼ぶ）することによって安定同位体の導入も行った。図2に反応の模式図を示す。図2の式5はグルタミン残基を含むタンパク質を示しており、R₁はペプチド鎖、N末端アミノ酸又は水素のいずれか、R₂はペプチド鎖、C末端アミノ酸又は水酸基のいずれかを示す。トランスグルタミナーゼの作用による修飾過程又は¹⁵N標識過程については、NMRを用いて検出し、¹H-NMR測定、¹H-¹⁵N HSQC測定（Bodenhausen, G. & Ruben, D. J. (1980) Chem. Phys. Lett. 69, 185.）を必要に応じて行った。各NMR測定には例えばBruker社製DMX-600スペクトロメーターを用い、測定試料には磁場の安定性を保つためのNMRロック用に5%のD₂Oを添加した。溶媒には20mMリン酸ナトリウム（pH6）を用い、反応温度は37℃とした。

【0020】実施例1（モデル化合物の¹⁵N標識グリシンによる修飾）

修飾すべきタンパク質のモデル化合物としてN-carbobenzoxyl-L-glutaminyglycine（以下CBZ-Gln-Glyと略す）を取り上げ、¹⁵N標識グリシンによる修飾過程を追跡することにした。CBZ-Gln-Gly 2.0mM、¹⁵N標識グリシン 10.5mM、MTG 4 μ Mとなるように混合してから157分後に最初の¹H-¹⁵N HSQCスペクトルを測定し、その後1時間ごとに同様の測定を行った。図3に反応時間とスペクトルを示す。各試薬の混合から測定までの時間がトランスグルタミナーゼ反応時間に相当する。¹H-¹⁵N HSQC測定では¹⁵Nと結合している¹H由来のシグナルのみが観測されるため、¹⁵N標識過程を定量的に追跡することができる。ただし、高濃度に存在するプロトン由来のピークを完全に消去することは難しく、図3では消え残ったピークにx印を付記してある。反応生成物では¹H-¹⁵N由来のシグナルが観測されることから、徐々にGln残基のカルボキシアミド窒素と¹⁵N標識グリシンの架橋反応が進行していることが判明した。以上の結果より、安定同位体を含む化合物による修飾が可能であること、及び、NMRを用いて修飾過程を追跡できることを示すことができた。また、グリシンを修飾することによって、電荷のないカルボキシアミドにカルボン酸を付加している。新たに電荷

を帯びた官能基を付加できることから、溶解性や安定性といった物性の改変が可能であることを示唆している。

【0021】実施例2（高分子量タンパク質の ^{15}N 標識グリシンによる修飾）

高分子量タンパク質として牛血清アルブミン（serum albumin, bovine、以下BSAと略す）を取り上げ、 ^{15}N 標識グリシンによる修飾を行った。BSA 2.4mM、 ^{15}N 標識グリシン 127mM、MTG 32 μM となるように混合し、2日間インキュベートした後、 ^1H - ^{15}N HSQC測定を行った。 ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル上に1つの相関ピークが観測され、少なくとも1個の ^{15}N 標識グリシンがBSAのグルタミン残基へと結合したことが判明した（図4）。

【0022】実施例3（タンパク質の修飾による溶解性および安定性の改善）

実施例2記載の試料（以下グリシン化BSAと略す）とBSAの物性を比較した。対象試料には、MTGを添加していないこと以外の条件を同じとするために、BSA 2.4mM、 ^{15}N 標識グリシン127mMのみを2日間インキュベートしたものをを用いた。室温におけるBSAの溶解性および安定性は高いため、温度を上げてBSAが会合しやすい状態を作り出すことにした。また、NMR解析においては、タンパク質分子の回転・並進運動の増大に伴ってシグナル緩和が軽減され、解析し易いスペクトルが得られることが知られている。そのため、回転・並進運動を増大させるために、タンパク質が安定に保たれる範囲で、なるべく高い温度で測定する傾向がある。したがって、高い温度条件下において溶解性および安定性が改善されることは、NMR解析にとって好ましく、構造解析に有利に働く。

【0023】両試料5 μl を72℃、10分間インキュベートしたところ、白い沈殿が生じた。これを995 μl のリン酸バッファーに懸濁した後、15,000rpm、3minにて遠心し、上清について280nmの吸光度（以下 OD_{280} と略す）を比較した。濃度が高いほど OD_{280} の値は大きくなり、溶解性及び安定性に優れていることを示している。グリシン化BSAでは $\text{OD}_{280} = 0.459 \pm 0.004$ 、BSAでは $\text{OD}_{280} = 0.366 \pm 0.006$ となり、グリシン化BSAの方が高い濃度を保持しており、グリシンにより修飾することによって溶解性及び安定性が改善されていることが判明した。なお、測定結果は、2回の実験の平均値及び標準偏差を記載し

た。

【0024】実施例4（タンパク質の立体構造に及ぼす修飾の影響）

実施例2記載のグリシン化BSAと、BSAの立体構造を比較するために、 ^1H -NMRスペクトルを測定した（図5 A, B）。測定温度は37℃である。購入したBSA（Sigma社製品）に含まれていた未知の低分子化合物由来のピークが3.70ppmに、未反応のグリシンのアルファプロトン由来のピークが3.85ppmに、水由来のピークが4.70ppmに観測され、その他のシグナルがグリシン化BSA（図5 A）又はBSA（図5 B）由来のものである。高次構造を保持しているタンパク質に特徴的な0ppm近傍のシグナルをはじめとして、ほとんどのシグナルにおいてグリシン化による化学シフト変化が起っていない。したがって、BSAの立体構造を損ねることなく、グリシンにより修飾できていることが判明した。

【0025】

【発明の効果】本発明によれば、任意のタンパク質と1級アミン又はグルタミン残基を含むペプチドとにトランスグルタミナーゼを作用させることにより、当該タンパク質をその本来の立体構造を損うことなしに修飾し、立体構造解析に適した構造解析用タンパク質試料を調製することができる。更に、修飾する化合物として安定同位体を含むものを用いることにより、精度の高い構造解析を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】タンパク質グルタミン残基、リジン残基の修飾工程における反応様式を示したものである。

【図2】グルタミン残基へ ^{15}N グリシンを修飾する工程の反応様式を示したものである。

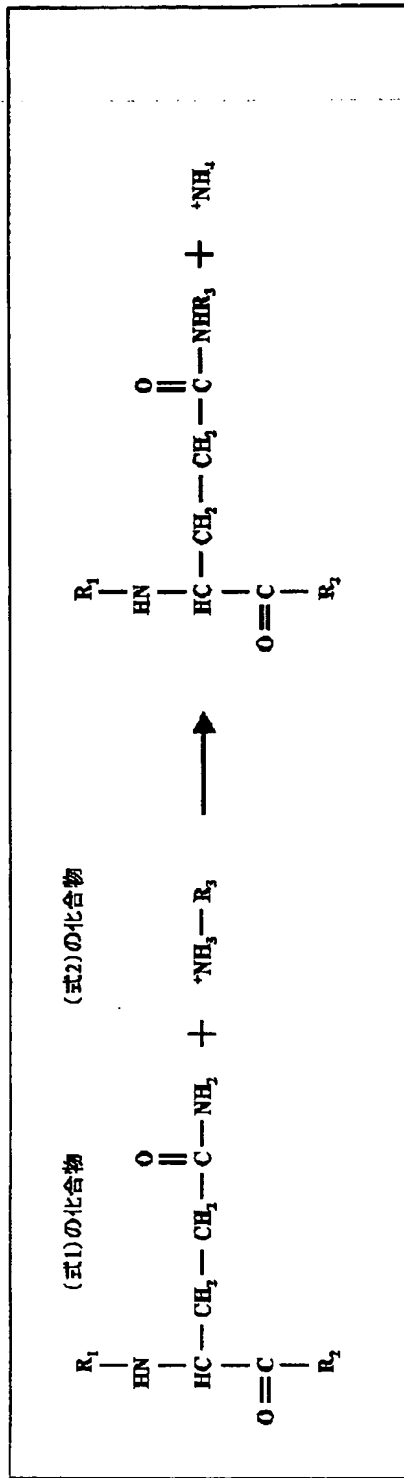
【図3】 ^{15}N 標識グリシンによるN-カルボベンゾキシ-L-グルタミニル-グリシンの修飾過程における ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルの経時変化を示したものである。

【図4】 ^{15}N 標識グリシンによって修飾されたBSAの ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルである。

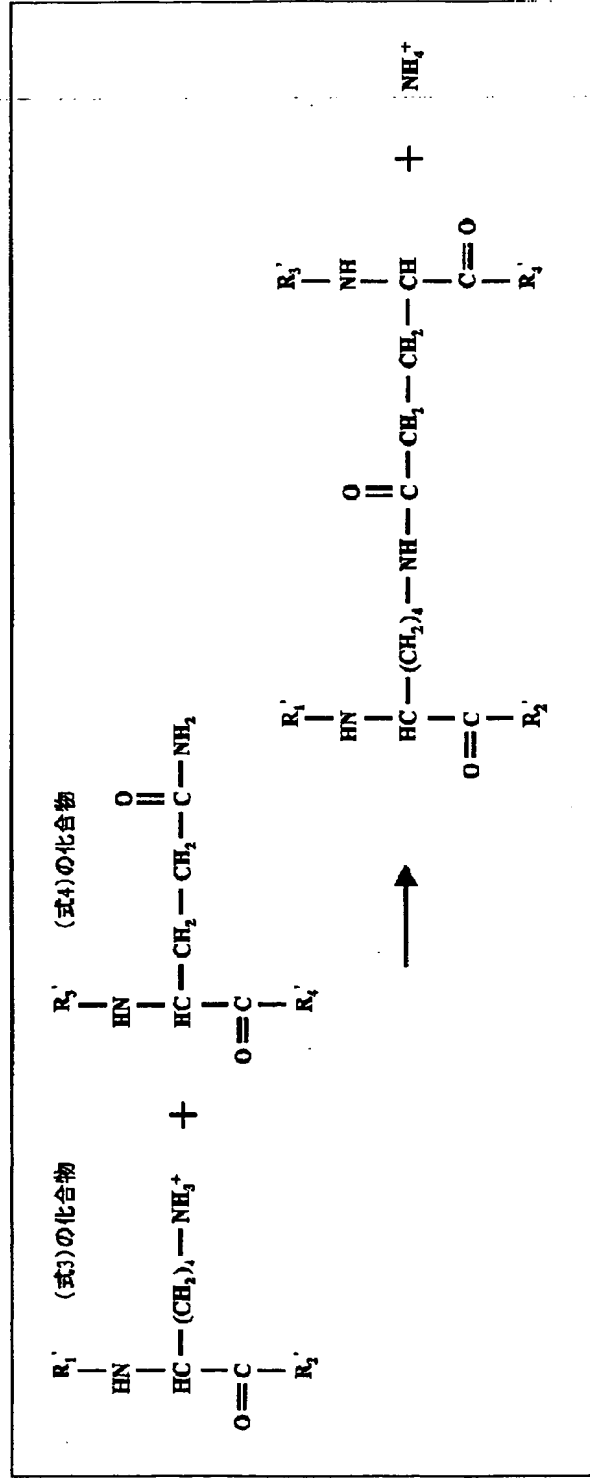
【図5】（A）はBSAの ^1H -NMRスペクトルである。（B）は ^{15}N 標識グリシンによって修飾されたBSAの ^1H -NMRスペクトルである。

【図1】

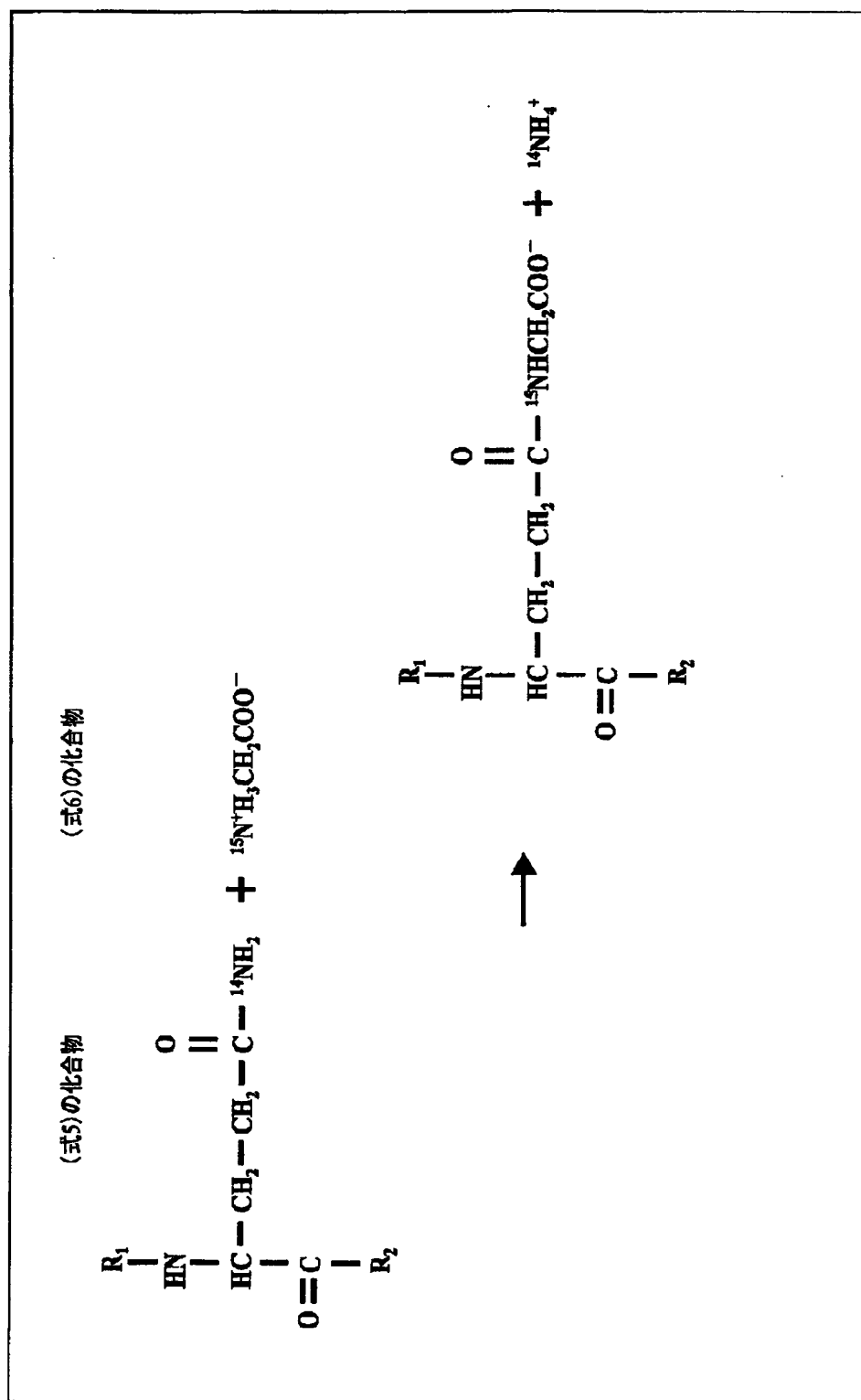
(A) グルタミン残基の酵素修飾の模式図



(B) リジン残基の酵素修飾の模式図

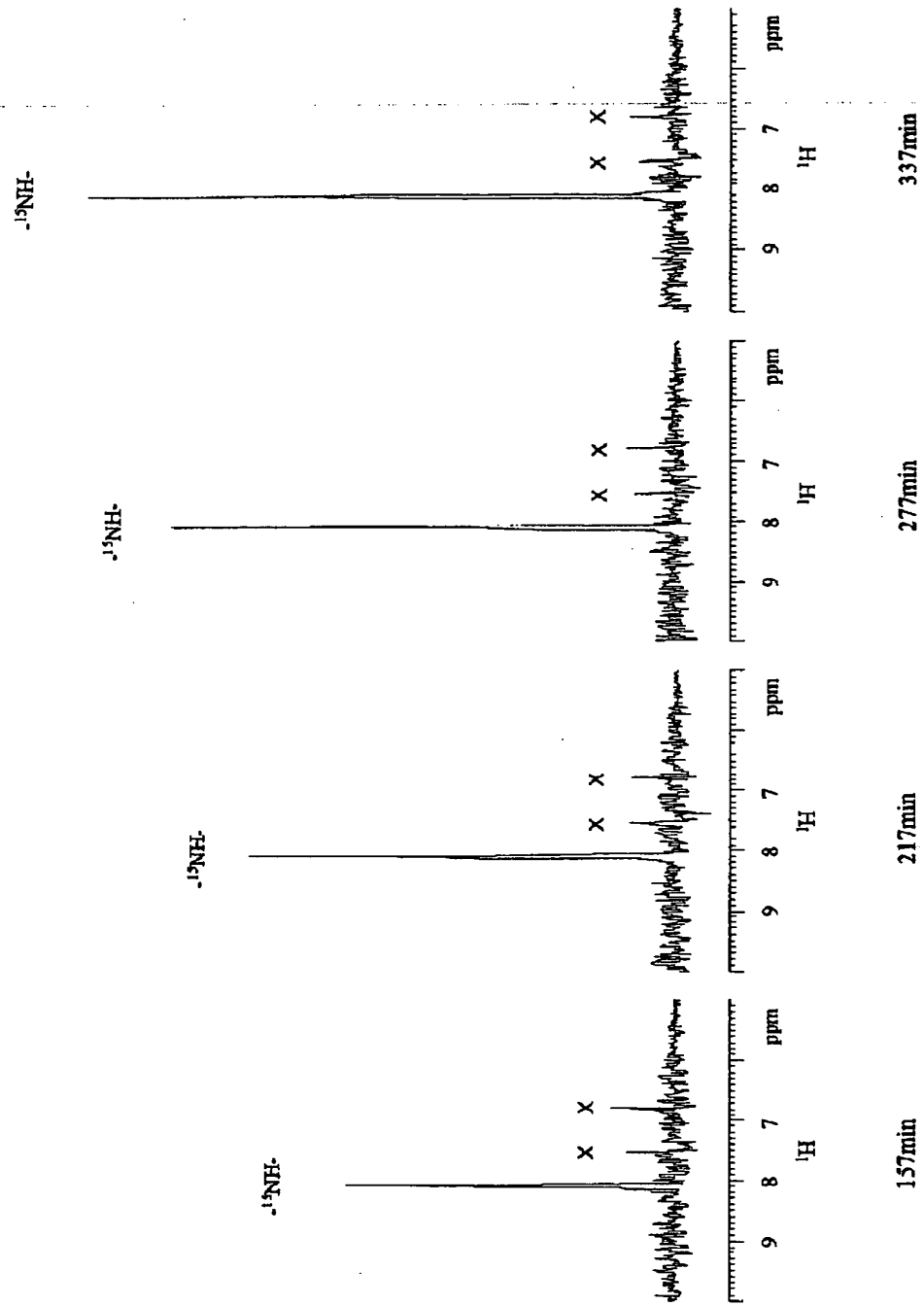


グルタミン残基へ¹⁵N標識グリシンを修飾する過程を示した模式図

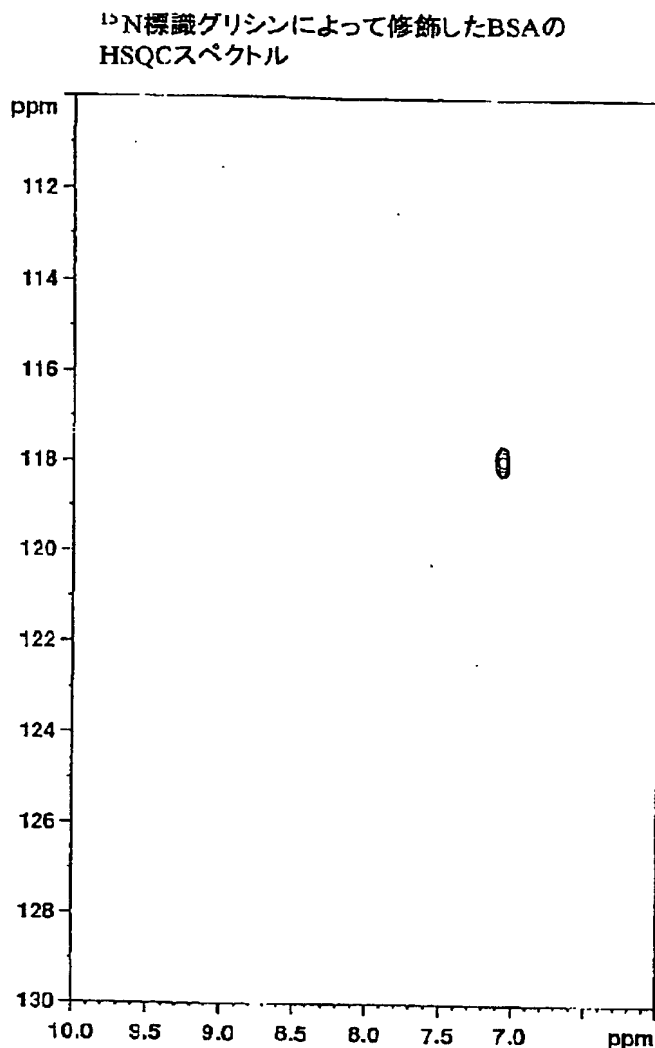


【図3】

^{15}N 標識グリニンによって修飾したCBZ-Gln-GlyのHSQCスペクトル

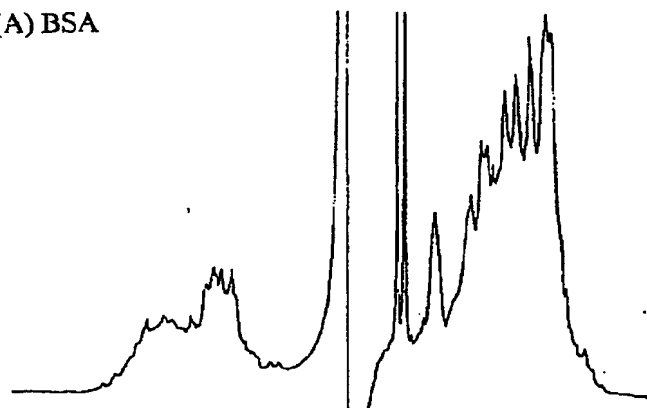
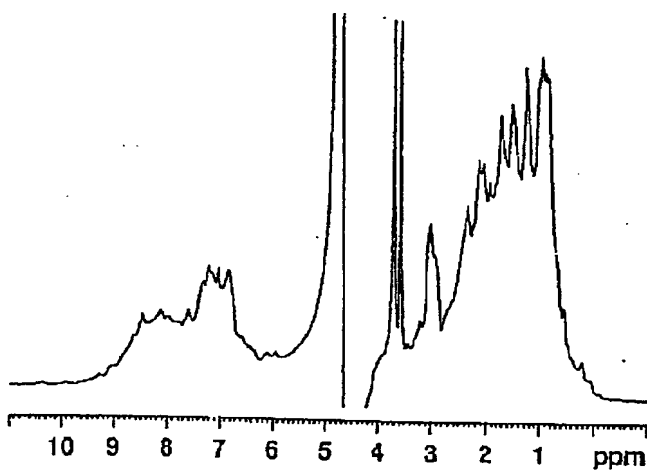


【図4】



【図5】

(A) BSA

(B) ¹⁵N標識グリシンによって修飾したBSA

【手続補正書】

【提出日】平成13年6月13日(2001. 6. 13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項5

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項5】 グルタミン残基を含むペプチドがN-カルボベンゾキシ-L-グルタミニル-グリシン、N-カルボベンゾキシ-L-グルタミニル-L-グルタミニル-グリシンおよびN-カルボベンゾキシ-グリシル-グリシル-L-グルタミニル-グリシンからなる群より選ばれる、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正内容】

【0008】本発明は、トランスグルタミナーゼ触媒反応を利用して、タンパク質のグルタミン残基又はリジン残基、又はその両方の修飾を行う工程を含む。図1に酵素反応様式を模式的に示した。式1、式3はそれぞれグルタミン残基、リジン残基を含むタンパク質を示しており、 R_1 、 R_1' はペプチド鎖、N末端アミノ酸又は水素のいずれか、 R_2 、 R_2' はペプチド鎖、C末端アミノ酸又は水酸基のいずれかを示し、該タンパク質がトランスグルタミナーゼの基質となる限りにおいて特に制限はない。式2はトランスグルタミナーゼが作用する1級アミノ基を含む化合物を示しており、 R_3 に制限はなく、式2で示した1級アミノ基を含む化合物の具体例としては、ヒドロキシルアミン、グリシン、リジン、硫酸水素アミノエチル、リン酸アミノエチル、アミノエタノール、リジン

を含むペプチドなどを挙げることができる。式4はトランスグルタミナーゼが作用するグルタミン残基を含むペプチドで、 R_3' はペプチド鎖、N末端アミノ酸又は水素のいずれか、 R_4' はペプチド鎖、C末端アミノ酸又は水酸基のいずれかを示し、該ペプチドがトランスグルタミナーゼの基質となる限りにおいて特に制限はない。式4で示したグルタミン残基を含むペプチドは、カルボベンゾキシ基、糖鎖、ミリストイル基、リン酸基のような置換基で修飾されていてもよく、その具体例としては、N-カルボベンゾキシ-L-グルタミニル-グリシン (N-carbobenzoxyl-L-glutaminyL-glycine) (CBZ-Gln-Gly)、N-カルボベンゾキシ-L-グルタミニル-L-グルタミニル-グリシン (N-carbobenzoxyl-L-glutaminyL-L-glutaminyL-glycine) (CBZ-Gln-Gln-Gly)、N-カルボベンゾキシ-グリシル-グリシル-L-グルタミニル-グリシン (N-carbobenzoxyl-glycyl-glycyl-L-glutaminyL-glycine) (CBZ-Gly-Gly-Gln-Gly)などを挙げることができる。

<配列表フリーテキスト>

配列番号1：トランスグルタミナーゼの基質

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正内容】

【0025】

【発明の効果】本発明によれば、任意のタンパク質と1級アミン又はグルタミン残基を含むペプチドとにトランスグルタミナーゼを作用させることにより、当該タンパク質をその本来の立体構造を損うことなしに修飾し、立体構造解析に適した構造解析用タンパク質試料を調製することができる。更に、修飾する化合物として安定同位体を含むものを用いることにより、精度の高い構造解析を行うことができる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto CO., Inc.

<120> A method of preparing proteins for structural analysis

<130> Y1H0417

<140> 2000-141151

<141> 2000-05-15

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:substrate for transglutaminase

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

<223> Xaa is N-carbobenzoxyl-glycyl residue

<400> 1

Xaa Gly Gln Gly

1

フロントページの続き

(72)発明者 横山 敬一

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB60 DA36 FA40

4B064 AG01 BH04 CA21 CB30 CD13
CD20 DA13

4H045 AA20 BA11 BA13 DA89 EA50
FA70

THIS PAGE BLANK (USPTO)